Morphometrische Analyse an Ehrlich –Ascitestumorzellen

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Michael Schmidt

Saarbrücken

1971

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Aus dem Institut für Zytologie und Elektronenmikroskopie der Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. phil. Hellmuth Sitte

MORPHOMETRISCHE ANALYSE AN EHRLICH -ASCITESTUMORZELLEN

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der Doktorwürde der
hohen medizinischen Fakultät der
Universität des Saarlandes

1970

vorgelegt von
Michael Schmidt
geb. am 18.8.1942 in Neunkirchen

Dekan: Prof. Dr. G. Dhom
Referent: Prof. Dr. G. Werner

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Promotiensdatum am 25. 1. 1971

Einleitung

Zum Erfassen von Veränderungen der Feinstruktur, welche durch experimentelle Eingriffe hervorgerufen werden, sind Einzelzellen besonders geeignet. Nur an freien Zellen ist die sichere Reproduzierbarkeit der Versuche gewährleistet, da verschiedenste Medien innerhalb minimaler Zeitspannen mit ihnen in Kontakt gebracht werden können und unterschiedliche Diffusionswege keine Rolle spielen. Von den für Experimente verfügbaren Einzelzellen sind Leukozyten zwar leicht zugänglich, es bestehen jedoch hinsichtlich der morphologischen und funktionellen Eigenschaften der einzelnen Gruppen zu große Unterschiede. Insbesondere weisen die verschieden alten Blutzellen stark abweichende Kern-Plasma-Relationen auf.

Ascitestumorzellen stellen dagegen eine weitgehend homogene Population dar. Sie verfügen außerdem über reichlich Zytoplasma und Organellen. Beides sind Voraussetzungen für eine verläßliche statistische Auswertung des Materials.

Über Ascitestumorzellen liegt bereits eine sehr umfangreiche Literatur vor. Darunter befinden sich auch mehrere licht- und elektronenoptische Untersuchungen nach experimenteller Zellschädigung, von denen die folgenden nur kurz erwähnt seien: G. Klein u. A. Forsberg (1954), B. Zbarsky, Dmitrieva u. Germolayeva (1962), Yasuzumi u. Sugihara (1963), Yasu u. Sigiha (1964), J.W. Harris (1967).

Alle diese Arbeiten enthalten keine genauen quantitativen Angaben über die Zellveränderungen. Eine submikroskopische Analyse verschiedener in den einzelnen Zellkompartimenten ablaufender Prozesse ist jedoch nur dann möglich, wenn die

Veränderungen an den vorhandenen Zellstrukturen quantitativ erfaßt werden können. Derartige Analysen sind erst jetzt durch die in jüngster Zeit entwickelten Punktzählverfahren möglich geworden.

Grundlage für alle weiteren experimentellen Arbeiten ist die Kenntnis des genauen Anteils der verschiedenen Zellkompartimente in der normalen Ascitestumorzelle. Die vorliegende Untersuchung, in welcher die neueren Methoden angewandt wurden, dient diesem Zweck. Sie wurde vorgenommen im Hinblick auf später vorgesehene Studien der Kurzzeitveränderungen nach hohen Dosen von Röntgenstrahlen.

Darstellung der eigenen Befunde

1. Beobachtung und Methodik

Ascitestumorzellen konnten in genügenden Mengen aus Peritonealflüssigkeit gewonnen werden, wenn den Versuchtstieren (weiße Mäuse) sechs bis sieben Tage zuvor eine Suspension von Ehrlich-Ascitestumorzellen intraperitoneal injiziert worden war.

Für eine Einbettung genügten etwa 3 ml Peritonealflüssigkeit. Nach den Vorversuchen zur Entwicklung einer geeigneten Methodik wurden insgesamt fünf Einbettungen ausgewertet.
Das Exsudat wurde 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert und das Serum abgegossen. Das verbleibende

Sediment wurde in 5 ml 1%-iger gepufferter OsO_4-Lösung nach Caulfield zehn Minuten lang bei Zimmertemperatur fixiert. Daran schloß sich die stufenweise Entwässerung mit Azeton und die Einbettung nach dem üblichen Verfahren in Araldit an.

Zur Orientierung wurden 1 µ dicke Schnitte angefertigt und phasenkontrastmikroskopisch untersucht. Geeignete Stellen im Block ließen sich so für das Elektronenmikroskop auswählen. Die Blöcke wurden mit dem Ultramikrotom Om U2 von Reichert geschnitten. Die Schnitte wiesen mattgoldene Interferenzfarben auf, entsprechend einer Schnittdicke von 600-800 AE. Da die morphometrische Auswertung besonders kontrastreiche Bilder erfordert, wurde die Doppelkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat nach Reynolds (1963) angewendet. Optimaler Kontrast trat bereits nach 5 Minuten langer Einwirkung der beiden Lösungen auf. Die Schnitte wurden mit dem Elmiskop I von Siemens bei 5000-facher Primärvergrößerung aufgenommen und drei- bis vierfach nachvergrößert.

Zählmethodik

Zur Bestimmung der Volumenanteile der Zellkompartimente wurde Rasterpapier benötigt, das den Zellen auflag. Die Kreuzpunkte, die auf die einzelnen Strukturen fielen sowie die Schnittpunkte der waagrechten und senkrechten Linien mit der Zellmembran waren zu zählen. Kreuzpunkte, die von der Membran eines Zellkompartiments berührt wurden, waren als halber Treffer zu werten. Zu kleine Raster erwiesen sich wegen des großen Aufwandes und der überhöhten Genauigkeit am Einzelbild als nicht sinnvoll;

zu große dagegen führten zu statistisch wenig zuverlässigen Werten.

Bei dieser Arbeit brachten 10 mm Raster hinreichend genaue Ergebnisse. Die Trefferzahlen für die Zellkompartimente und Zellmembranen wurden für jede Einbettung getrennt in der Tabelle 1 aufgeführt. In dieser Tabelle erschien auch die Summe aller Treffer für jede Zelle, so daß sich die prozentualen Anteile der Treffer für jedes Kompartiment einer jeden Zelle errechnen ließ. War zum Beispiel die Gesamtzahl der Treffer auf eine Zelle 100 und entfielen davon 10 Treffer auf die Mitochondrien, so ergab dies einen Anteil von 10% für die Mitochondrien am Volumen der Zelle. Von jeder einzelnen Einbettung wurden ferner die Mittelwerte für die Treffer pro Kompartiment und die Mittelwerte der prozentualen Trefferzahlen ermittelt.

Aufschlüsse über die Funktion einer Zelle kann das Verhältnis Volumen zu Oberfläche geben. Diese Relation wurde berechnet nach der Formel

$$\frac{O}{V} = \frac{\pi F \times Cx}{a \times Py} \qquad \text{(Sitte 1967)}$$

a= Rasterabstand (in dieser Arbeit 10 mm).

Bei z.B. 20.000-facher Vergrößerung entsprechen 1 µ in natura 20 mm auf dem Bild.
Der Rasterabstand a ist dann in natura:

$$a = \frac{10.000}{\text{Vergrößerung}} \qquad \text{o d e r :}$$

$$\text{Vergrößerung} = \frac{10.000}{a}$$

- in obige Formel eingesetzt:

$$\frac{O}{V} = \frac{\pi F \times Cx \times \text{Vergrößerung}}{10.000 \times Py}$$

Es gilt: fF = Verhältnis Halbkugelfläche zu Kreisfläche = 2 (=Proportionalitätsfaktor); Cx = Anzahl der Schnittpunkte; Py = Anzahl der Treffer. (s. Tabelle 3)

Um die Kontrolle der oben beschriebenen Zählmethode durchzuführen sowie die Streubreite der einzelnen Treffer zu erhalten, wurde die prozentuale Abweichung errechnet nach der Formel von Westphal (1937)

$$\Delta = \sqrt{\frac{\sum(\Delta_1^2 + \Delta_2^2 \cdots + \Delta_n^2)}{n(n-1)}}$$

Δ wurde für jedes Kompartiment einer Einbettung ermittelt und in Prozent umgerechnet. Δ_1 bedeutet hierbei in der Formel die Differenz des berechneten Mittelwertes in % für die betreffende Einbettung und des gemessenen prozentualen Wertes für die Zelle 1. (s. Tabelle 2)

Ergebnisse

Von insgesamt 8 Einbettungen mit Mäuseascitestumor wurden 5 ausgewertet. Im einzelnen ist dabei kurz zu bemerken:

Bei Einbettung 1 (s. Tabelle 1) handelt es sich um einen Ehrlich-Tumor, welcher fünf Tage vor Entnahme des Ascites implantiert worden war. In dieser Einbettung sind die größten Zellen vertreten. Insgesamt wurden 35 Zellen ausgewertet. Auf nicht weniger als sechs Zellen kamen über 300 Treffer, auf eine Zelle sogar über 400. Es wurde eine mittlere Trefferzahl von 247 errechnet. Die Zellmembranen umgrenzen viele Plasmaausstülpungen.

Die Kerne sind sehr unregelmäßig geformt: drei sind segmentiert, die restlichen oval bis polymorph. Fast alle enthalten Chromatinklumpen, die zentral oder peripher anzutreffen sind. Die Mitochondrien sind vielgestaltig und von sehr unregelmäßiger Größe. Ein Spalt zwischen äußerer und innerer Membran ist auf keiner der Aufnahmen klar zu erkennen. In den großen Zellen erscheinen die cristae mitochondriales unscharf, lassen sich dagegen bei den kleineren Zellen als Doppellamellen deutlich abgrenzen (Zelle 15, 22 usw.). Eine Relation der Mitochondriengröße zum Zellvolumen läßt sich nicht finden. Golgi-Apparate weisen nur die kleineren Zellen dieser Einbettung auf, bei denen sich auch das endoplasmatische Retikulum viel schärfer darstellt als bei den großen Zellen.

Der Tumor in Einbettung 2 (s. Tabelle 1) stammt von demselben Ausgangsmaterial wie 1. Er war lediglich einem anderen Tier eingepflanzt worden. Das Exsudat ist auch hier fünf Tage alt. Von dieser Serie wurden 39 Zellen ausgewertet. Im Gegensatz zur Paralleleinbettung 1 finden wir hier mittelgroße Zellen vor. Mit einer Ausnahme liegen die Trefferzahlen alle unter 260, der mittlere Wert beträgt 195. Auch hier trifft man wie in E_1 die unregelmäßigsten Kernformen an. Neben fast kreisrunden finden sich s- und ringförmige, welche organellenhaltige Zytoplasmabezirke umschließen. Auf fast allen Bildern sind röhrenförmige Plasmaeinstülpungen in den Kern quergetroffen. Betrachtet man die Zellen etwas genauer, so fällt der hohe Anteil des Kerns am Gesamtvolumen auf. Bei sieben Zellen nimmt der Kern mehr als 40 Prozent ein. Die Mitochondrien erscheinen bei dieser Einbettung etwas kleiner, ihre Anzahl pro Zelle etwas größer. Die cristae mitochondrial

sind auf allen Bildern als Doppelmembranen gut erkennbar. Fast bei allen Tumorzellen sind ein oder mehrere Golgi-Körper getroffen, deren Anteil am Gesamtvolumen 10 mal über 1,5% beträgt, bei Nr. 56 sogar 8,3%, sie ist mit 259 Gesamttreffern eine mittelgroße Zelle.

Einbettung 3 stammt von einem sechs Tage alten Tumor. In dieser Einbettung kommen wie in Nr. 1 einige besonders große Zellen vor, eine mit mehr als 400 und eine mit mehr als 300 Gesamttreffern. Der mittlere Wert beträgt 257 und ist damit sogar größer als in E_1. Jedoch haben bei insgesamt nur 12 Zellen die zwei mit Abstand größten einen erheblichen Einfluß auf den Mittelwert. Die Bilder dieser Zellen gleichen denen der vorangehenden Einbettungen weitgehend. Die Kernformen sind hier aber weitaus einheitlicher als bei E_2. Mitochondrien kommen wie bei E_1 in allen Größen vor. Nur etwa die Hälfte der Zellen enthält Golgi-Apparate, ihr Anteil am Volumen der einzelnen Zellen ist im Durchschnitt merklich kleiner als bei E_1 und E_2.

Die sechs Tage alten Zellen aus Einbettung 4 erreichen durchschnittliche Größen; die mittlere Trefferzahl beträgt 190. Es wurden 10 Zellen ausgewertet. Mit einer Ausnahme sind die Kerne alle oval mit vereinzelten kleineren Einziehungen. Eine Zelle scheint zwei Kerne zu enthalten. Der Kernanteil am Gesamtvolumen liegt zwischen 19 und 40%. Die anderen Organellen unterscheiden sich nicht wesentlich von denen der E_3.

Die zwölf Zellen der Einbettung 5 stammen von einem

sechs Tage vor Entnahme implantierten Tumor. Sie sind alle mittelgroß, der Mittelwert der Gesamttreffer liegt bei 195, es kommen nur geringe Abweichungen von diesem Wert vor. Zwei Kerne haben eine Gestalt, die an Monozytenkerne erinnert, die restlichen sind oval bis stabförmig.

Bei allen Einbettungen fällt auf, daß die Mitochondrien in den Zellen nicht diffus verstreut sind, sondern daß sie vornehmlich an der größten Breite des Plasmasaumes angehäuft liegen und sich sichelförmig um den Kern gruppieren. Zwei Einbettungen (Nr. 1 und 2) bestehen aus fünf Tage alten Zellen (insgesamt 74), die anderen drei Einbettungen (34 Zellen) sind sechs Tage alt. Zellen mit über 300 Treffern sind in beiden Gruppen zu finden (Nr. 1 und 3). Das Alter des Tumors dürfte also keinen Einfluß auf die Zellgröße haben. Ebenso finden sich bei den Kernformen oder der Anordnung der Mitochondrien keine wesentlichen Unterschiede.

Die Diagramme (1-5) veranschaulichen die prozentuale Verteilung der Zellkompartimente bei den einzelnen Einbettungen. Außer bei Einbettung 2 beträgt die Kern-Cytoplasma-Relation ziemlich konstant 1 : 2,4; bei Einbettung 2 ergibt das Verhältnis 1 : 1,5.

Die Werte für Mitochondrien schwanken in engen Grenzen zwischen 7,8 und 10% vom Gesamtvolumen. Die größte Abweichung vom Mittelwert beträgt -1,31%. Die errechneten Werte für das endoplasmatische Retikulum weisen demgegenüber etwas größere relative Unterschiede auf; zwischen 3,6 und 4,6%. Dies mag darauf beruhen, daß diese Organellen zum Teil in der Form kleinster, nicht mehr erfaßbarer Bläschen vorliegt.

Die relativen Unterschiede für Golgi-Apparat, Tropfen und Einschlüsse sind beträchtlich größer. In der Tabelle 3 sind die Verhältniswerte von Oberfläche zu Volumen für jede einzelne Zelle aufgeführt. Es zeigt sich, daß die Relationen sehr stark streuen: zwischen 9,6 bei der großen Zelle Nr. 2 und 22,8 bei der viel kleineren Zelle Nr. 32, deren lange Zytoplasmaausstülpungen an manchen Stellen wieder Verbindung mit der Zellmembran aufnehmen, so daß sich ein geschlossener Ring ergibt. Die Zelle Nr. 2, die der gleichen Einbettung wie Nr. 32 angehört, verfügt nur vereinzelt über längere Ausstülpungen. Da auf einigen Bildern benachbarte Zellen mit ihren Membranen aneinanderstoßen und somit die Zellgrenzen wegen der vielen Ausstülpungen schwer aufzufinden waren, konnten diese nicht zur Auswertung herangezogen werden. Das Ergebnis wurde mit einem Fragezeichen versehen. Dies ist bei 39 von den insgesamt 108 Zellen der Fall. 34 davon gehören zu Einbettung 2. Bei 31 Zellen, also fast der Hälfte der ausgewerteten, liegen die Werte zwischen 14 und 17.

Beim Vergleich des Verhältnisses $\frac{O}{V}$ mit der Zellgröße finden sich fast immer kleine Werte bei den großen Zellen. Die 9 Zellen von E_1 und E_3 mit mehr als 300 Treffern haben mit einer Ausnahme (Zelle 76 mit 14,1) Werte unter 13%, drei Zellen sogar unter 10%. Auf die Zellen mit $\frac{O}{V} >$ 20 fallen immer kleinere bis mittlere Gesamttrefferzahlen.

Diskussion

Beim Vergleich der fünf Einbettungen zeigen sich nur geringe Abweichungen der Werte für Plasma, Kern, Mitochondrien und endoplasmatisches Reticulum, obwohl die Einbettungen 1 und 2 aus fünf Tage alten und die restlichen aus sechs Tage alten Zellen bestehen. Auch die Größe der Zellen hat keinen Einfluß, insbesondere auf die Kern-Plasma-Relation und den Gehalt an Mitochondrien. Bei Einbettung 1 und 3 errechneten sich fast die gleichen Werte wie bei 4 und 5. Die Zellgröße hat jedoch einen Einfluß auf die Relation $\frac{O}{V}$. Eine streng proportionale Beziehung läßt sich jedoch nicht herausfinden. Außerdem dürfte das untersuchte Material zahlenmäßig nicht ausreichen, um eine allgemein gültige Aussage über diese Relation zu machen.

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, daß Ascitestumorzellen zum Erfassen von quantitativen Veränderungen an der Feinstruktur aus zweierlei Gründen besonders geeignet sind:

1. Die beschriebenen Versuche sind leicht reproduzierbar. Ascitestumorzellen kommen als Suspension freier Einzelzellen in einem Exsudat vor und sind durch Zentrifugieren leicht zu gewinnen. Das Fixieren und Einbetten dieser Zellen bereitet wenig technische Schwierigkeiten.

2. Trotz des unterschiedlichen Alters der Zellen, ihrer unterschiedlichen Größe und der Polymorphie der Kerne und der Zellmembran wurden mit einer

Ausnahme relativ einheitliche Werte für den Anteil der einzelnen Zellkompartimente am Gesamtvolumen erhalten. Dies, obwohl die Zellen wahllos durch verschiedene Ebenen geschnitten worden waren. Lediglich die Einbettung 2 fällt aus dem Rahmen. Während die Werte für Mitochondrien und endoplasmatisches Reticulum im Bereich der Norm liegen, ist der Kernanteil mit 40% weit über dem Durchschnitt. Daß in E_2 so hohe Kernanteile gefunden wurden, könnte ein Zufallsergebnis sein.

Zusammenfassung

An Ultradünnschnitten wurden die Volumenanteile einzelner Zellkompartimente sowie die Relation Zelloberfläche zu Zellvolumen von Ascitestumorzellen untersucht. Die Zellen verfügen über reichlich Zytoplasma und Organellen.

Die fünf bzw. sechs Tage alte Peritonealflüssigkeit entsprechend behandelter Mäuse wurde zentrifugiert und die sedimentierten Zellen nach dem üblichen Verfahren fixiert, entwässert, eingebettet und geschnitten. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Zellen in 20 000-facher Vergrößerung wurden morphometrisch ausgewertet. Dabei wurden die Treffer eines aufgelegten Rasters, die auf die einzelnen Kompartimente fielen, gezählt und in Tabellen aufgeführt. Mit diesen Werten ließen sich die Volumenanteile der einzelnen Organellen, des Plasmas und des Kerns errechnen.

An vier Einbettungen fand sich eine Kern-Zytoplasma-Relation von ~1:2,4 bei einer Einbettung von 1:1,5. Die Werte für Mitochondrien schwankten zwischen 7,8 und 10%, der Anteil für endoplasmatisches Reticulum lag zwischen 3,6 und 4,6%. Die relativen Differenzen für Golgi-Apparate, Tropfen und Einschlüsse waren beträchtlich größer. Das Verhältnis der Zelloberfläche zum Zellvolumen errechnete sich zwischen 9,6 : 1 und 22,8 : 1.

Einbettung 1

Zelle Nr.	Plasma %	Treffer	Kern %	Treffer	Mitochondrien %	Treffer	ER %	Treffer	Golgi-Apparat %	Treffer	Tropfen %	Treffer	Einschlüsse %	Einschlüsse	Gesamt-Treff.	Schnittpunkt-Mittel
1	64	274	29,85	128	6,2	26,5	0,23	1							429,5	133,5
2a	55	207	38,3	145	5,44	20,5	0,66	2,5			0,53	2			377	91
2b	68	225	19,66	65	11,18	37	1,58	3,5			0,15	0,5	0,15	0,5	331,5	79
3	60,01	219	32,2	117,5	4,12	15,5	2,49	9			0,82	3			364	99,5
4	54,2	144	33,7	90,5	10,45	28	2,02	5,5			0,18	0,5			268,5	70
5	59,1	203,5	27,27	94	5,24	18,5	1,45	5			6,25	21,5	0,44	1,5	344	92
6a	55,7	160	26	74,5	10,8	31	1,22	3,5	1,74	5	4,71	13,5			287,5	80
6b	49	164	38,5	125	8,86	29	1,68	5,5					0,46	1,5	327	115
7	71,6	130,5	19,5	35,5	3,82	7	3,82	7					0,82	1,5	182,5	55,5
9	59	164	28	78	8,8	24,5	3,22	9			0,36	1	0,72	2	278,5	69,5
10	59,2	197,5	26,22	87,5	9,24	30,5	1,21	4			3,61	12			331,5	74,5
11	63,4	172	23,8	63,5	8,28	22,5	4,58	12,5					0,55	1,5	272	109,5
12	78,5	189,5			13,08	31,5	7,06	17	1,24	3					241,5	109,5
13	59,1	107	26,65	46,5	4.97	9	8,58	15,5	1,38	2,5					181,5	81
14	63,9	152	21,9	53	6,2	15	5.16	12,5	3,93	9,5					242	79,5
15	65,7	141,5	16,05	34,5	11,6	25	5,82	12,5			0,7	1,5			215	77,5
16	66	157	22,82	54	2,94	7	5,04	12	3,57	12					238,5	89,5
17	56	97	29,45	51	4,22	8,5	7,24	12,5	2,1	3,5			0,28	0,5	173	70
18	67,2	147	10,5	23	8,45	18,5	9,14	20	5,03	11					219,5	89,5
19	73,6	218	16,05	47,5	5,75	17	4,23	12,5					0,33	1	296	91,5
20	66,4	136,5	20,0	41	9,75	20	3,41	7	0,24	0,5					205	68
21	57,8	108	33,2	62,5	6,69	12,5	2,41	4,5							187,5	68
22	57,8	126,5	15,78	34,5	13,26	29	3,21	7	3,93	19,5	0,91	2			218,5	95,5
23	57,2	94,5	29,7	49	3,63	6	6,67	11	2,72	4,5					165	85
24	60,6	130,5	22,25	48	4,18	9	7,21	15,5	3,49	7,5	1,39	3	0,93	2	215,5	74,5
25	58,0	127	21,7	47,5	14,61	32	5,25	11,5					0,45	1	219	81

26	54,6	155,5	28,9	82	8,27	23,5	6,86	19,5			1,26	3,5	0,17	0,5	284,5	109,5
27	54,6	100,5	33,15	61	7,60	14	3,26	6	0,54	1			0,81	1,5	184	58
28	54,6	116,5	30,65	66	6,5	14	5,80	12,5	2,55	5,5			0,46	1	215,5	69,5
29	53,6	103	25,78	49,5	14,6	28	5,99	11,5							192	77
30	59,8	90	33,38	50,5	3,99	6	2,32	3,5					0,33	0,5	150,5	73,5
31	77,0	136	9,92	17,5	9,92	17,5	3,12	5,5			0,56	1			176,5	87,5
32	61,7	122,5	25,18	50	4,78	9,5	7,05	14					1,12	2,5	198,5	104,5
33	64,6	156,5	21,56	52,5	6,99	14,5	5,38	13	1,65	4			0,62	1,5	242	73,5
34	49,5	103	40,8	85	6,01	12,5	3,36	7	0,24	0,5					208	82

Einbettung 2

elle	Plasma %	Plasma Treffer	Kern %	Kern Treffer	Mitochondrien %	Mitochondrien Treffer	ER %	ER Treffer	Golgi-Apparat %	Golgi-Apparat Treffer	Tropfen %	Tropfen Treffer	Einschlüsse %	Einschlüsse Treffer	Gesamt-Treffer	Schnittp.Mitt
35a	39,4	80,5	44,6	91	10,05	20,5	3,18	6,5	2,20	4,5	0,49	1			204	56
35b	44,2	61,5	36,7	51	9,36	13	3,6	5	2,16	3	2,52	3,5	1,44	2	139	60
36	41,1	55	39,9	53,5	8,95	12	7,08	9,5	1,12	1,5	0,74	1	1,12	1,5	134	51,5
37	54,6	126	29,9	69	5,63	13	5,85	13,5	1,73	4	1,08	2,5	1,08	2,5	230,5	97,5
38	54,4	129	25,7	61	11,20	28,5	5,06	12	1,05	2,5	1,90	4,5			237,5	64,5
39	52,7	80	25,7	39	11,22	17	4,62	7	4,28	6,5			1,32	2	151,5	37
40	44,5	71,5	39,2	63	6,54	10,5	4,05	6,5	3,74	6	1,24	2	0,62	1	160,5	55
41	51,6	98,5	32,2	61,5	10,72	20,5	3,93	7,5			0,52	1	1,04	2	191	64
42	43,6	67	43,6	67	3,25	5	8,47	13					0,97	1,5	153,5	56
43	64,8	144,5	19,9	44,5	5,38	12	5,83	13	2,46	5,5	1,12	2,5	0,44	1	223	81
44	68,9	137,5	18,3	36,5	7,51	15	3,01	6	0,51	1	1,51	3	0,25	0,5	199,5	117
45	50,3	112	29	64,5	11,9	26,5	4,04	9	2,92	6,5	1,8	4			222,5	105
46	46,6	89	38,4	73	7,37	14	5,28	10,5	1,84	3,5					190	66
47	43,5	62	43,7	62,5	8,74	12,5	1,40	2	2,79	4					143	30
48	49,1	110,5	26,8	60,5	14,2	32	4,0	9	3,32	7,5	2,66	6			225,5	63
49	48,0	113,5	31,9	75,5	7,4	17,5	6,77	16	2,32	5,5	2,96	7	0,63	1,5	236,5	114
50	47,6	86,5	39,65	72	6,88	12,5	3,58	6,5	1,65	3	0,55	1			181,5	66
51	48,5	117,5	36,2	88	7,64	18,5	7,64	18,5	2,88	7	3,09	7,5	1,44	3,5	242,5	81,5
52	48,8	121,5	37,57	94	9,36	23,5	1,99	5	0,59	1,5	1,59	4	0,59	1,5	251	123
53	56,5	147,5	21,1	55,5	11,88	31	4,97	13	2,3	6	3,06	8			261	64
54	52,8	85,5	32,8	53	6,51	10,5	1,86	3			5,58	9	0,31	0,5	161,5	74,5
55	50,0	86,5	36,4	63	7,22	12,5	3,27	5,5			3,27	5,5			173	73

56	52,5	136	12,54	32,5	21,8	56,5	3,67	9,5	8,3	21,5	0,57	1,5	0,57	1,5	259	141
57	57,4	85	32,78	48,5	5,07	7,5	1,69	2,5	2,02	3	2,34	2			148,5	52
58	43,5	101	43,3	100,5	6,02	14	2,58	6	3,01	7	1,72	4			232,5	77,5
59 a	52,2	96,5	33,1	61,5	11,08	20,5	2,97	5,5			0,54	1			185	65,5
59 b	65,0	81	2,89	3,5	16,55	20	3,71	4,5	0,83	1	9,08	11				
60	45,8	89,5	38,6	75	9,28	18	5,66	11			0,25	0,5	0,25	0,5	194,5	63
61	42,2	75,5	39,7	71	8,66	15,5	4,19	7,5			5,31	9,5			179	80
62	48,2	122,5	33,7	85,5	10,22	26	2,75	7	0,39	1	4,53	11,5	0,19	0,5	254	114,5
63	47,3	76,5	40,6	65,5	9,6	15,5	1,85	3			0,62	1			161,5	76
64 a	44,0	66	49,0	73,5	1	1,5	5,66	8,5	0,33	0,5					150	80
64 b	48,1	147,5	38,3	118,5	7,96	24,5	4,06	12,5			1,62	5			308	124
65	43	56,5	39,6	51	11,95	15,5	2,7	3,5	0,77	1	0,77	1	0,77	1	129,5	45,5
66	51,6	78	30,8	45,5	11,9	18	2,3	3,5	1,32	2	1,32	2	1,32	2	151	61,5
67	39,65	86	41,6	90,5	10,6	23	6,0	13	1,61	3,5	0,69	1,5			217,5	78
68	64,3	125	23,21	45,5	7,4	14,5	2,29	4,5	1,02	2	1,53	3	0,25	0,5	196	68
69	53,6	85,5	30,4	48,5	8,78	14	4,39	7	1,57	2,5			1,25	2	159,5	44,5
70	49,1	123	38,3	96	6,77	17	3,58	9	0,99	2,5	1,59	4			251,5	75

Einbettung 4

	Plasma		Kern		Mitochondrien		ER		Golgi-Apparat		Tropfen		Einschlüsse		Gesamt-Treffer	Schnittp.M.
elle	%	Treffer	%	Treffer	%	Treffer	%	Treffer	%	Treffer	%	Treffer	%	Treffer		
71	51,3	121,5	28,8	68	8,35	19,5	6,35	15	0,85	2	4,45	10,5			236,5	75
72	56,0	139,5	29,5	72,5	6,64	16,5	3,21	8	2,01	5	3,01	7,5			249	107
73	58,5	159	33,9	92,5	4,23	11,5	2,76	7,5	0,73	2					272,5	85,5
74	64,6	286	21,4	95	9,0	40.	3,94	17,5	0,67	3	0,11	0,5	0,22	1	443	127
75																
76	73,1	222	15,68	48	6,91	21	2,96	9			0,82	2,5	0,49	1,5	304	97,5
77	71,1	143	14,44	29	5,98	12	3,24	6,5			5,23	10,5			201	72,5
78	65,6	177,5	14,8	40	10,74	29	5,53	15	2,96	8	0,36	1			270,5	85,5
79	68,2	80,5	22,45	26,5	5,08	6	3,39	4			o,84	1			118	48,5
80	57,6	121	35,45	74,5	8,33	17,5	4,76	10	2,85	6			0,47	1	210	70
81	60,6	173	23,9	68,5	10,84	31	2,44	7			2,27	6,5			286,5	74

Einbettung 3

e	Plasma %	Plasma Treffer	Kern %	Kern Treffer	Mitochondrien %	Mitochondrien Treffer	ER %	ER Treffer	Golgi-Apparat %	Golgi-Apparat Treffer	Tröpfen %	Tröpfen Treffer	Einschlüsse %	Einschlüsse Treffer	Gesamt-Treff	Schnittp.Mitt.
	62,7	105,5	19,6	33	11,0	18,5	4,74	8	2,07	3,5					168,5	80,5
	63,0	77,5	17,89	22	8,53	10,5	5,28	6,5	5,28	6,5					123	57,5
	60,6	127,5	24,18	50,5	7,42	15,5	3,01	8,5	2,15	4,5	1,19	2,5			209	78
	69,4	110,5	7,86	12,5	15,37	24,5	4,7	7,5	1,56	2,5	0,94	1,5	0,36	0,5	159,5	67
	61,8	126,5	23,9	49	6,36	13	3,66	7,5	0,48	1	2,93	6	0,72	1,5	204,5	99,5
	46,7	89	40,6	77,5	5,76	11	4,73	9			2,1	4			190,5	74,5
	53,4	106,5	33,2	66,5	4,52	9	3,51	7	1,00	2	3,76	7,5	0,25	0,5	199	82,5
	57,4	112	31,3	61	5,39	10,5	5,13	10			0,51	1	0,51	1	195,5	98
	59,6	170,5	25,85	74	9,62	27,5	4,2	12			0,69	2			36	106
	59,1	103	25	53,5	5,45	9,5	2,88	5			1,72	3			:	51

Einbettung 5

Zelle	Plasma		Kern		Mitochondrien		ER		Golgi-Apparat		Tropfen		Einschlüsse		Gesamt.Treff.	Schnittp.Mitt.
	%	Treffer	%	Treffer	%	Treffer	%	Treffer	%	Treffer	%	Treffer	%	Treffer		
93	67,3	116,5	11,4	19,5	13,75	23,5	5,26	9			1,17	2	0,29	0,5	171	91
94	54,4	156,5	23,6	67	11,47	33	6,79	19,5	2,08	6	1,47	2,5	0,86	2,5	288	88,5
95	69,8	106	17,78	27	6,91	10,5	4,27	6,5			1,31	2			152	59
96	59,0	89	23,18	35	5,97	9	3,95	6	4,98	7,5	1,99	3	1,32	2	151,5	63,5
97	47,7	91	44,1	84	4,19	8	2,88	5,5	0,52	1			0,52	1	190,5	56
98	50,7	112	3459	76,5	4,74	10,5	2,71	6	4,74	10,5	2,48	5,5	0,22	0,5	221,5	83
99	50,2	106	30,05	63,5	11,38	24	3,79	8	4,5	9,5					211	75,5
100	49,4	94,5	29,6	56,5	8,11	15,5	4,71	9	4,71	9	3,4	6,5	0,52	1	191	66,5
101	56,7	92	14,48	24	14,48	24	5,24	8,5	1,23	2	6,79	11	0,61	1	162,5	51
102	53,9	152	16,31	46	19,13	54	4,96	14	1,24	3,5	4,43	12,5	0,17	0,5	282,5	114,5
103	55,03	104,5	30,08	57	8,47	16	3,96	7,5			2,38	4,5			189,5	65
104	61,6	84	22,05	30	5,88	8	6,25	8,5	2,2	3	0,73	1	1,1	1,5	136	69,5

Tabelle 2

	Plasma	Kern	Mitos	ER	Golgi	Tropfen
E 1	2,03	5,74	7,53	9,1	32,4	30,7
E 2	2,35	4,42	6,08	6,28	11,72	16,78
E 3	3,58	8,87	8,0	10,9	33,4	39,2
E 4	3,26	10,95	13,4	6,64	50,4	25,7
E 5	3,65	10,72	12,5	7,68	26,3	25,9

Tabelle Nr. 2:

Prozentuale Abweichung der Zählwerte aller Zellkompartimente für jede Einbettung errechnet nach der Formel von Westphal (1937).

Tabelle 3

Zelle Nr.	Relation $\frac{O}{V}$
1	12,8
2 a	9,8
2 b	9,6
3	10,9
4	10,9
5	11,3
6 a	11,7
6 b	14,9
7	12,8
9	10,6

Zelle Nr.	Relation $\frac{O}{V}$
10	9,3
11	16,8
12	19,9
13	18,8
14	13,7
15	15,2
16	16,1
17	17,3
18	17,4
19	13,3

Zelle Nr.	Relation $\frac{O}{V}$
20	14,3
21	15,6
22	18,8
23	22,1
24	14,7
25	15,8
26	16,2
27	13,4
28	13,7
29	16,9

Zelle Nr.	Relation $\frac{O}{V}$
30	20,9
31	21,2
32	22,8
33	13,0
34	17,1
35 a	11,7 (?)
35 b	18,5 (?)
36	16,2 (?)
37	17,6 (?)
38	11,6 (?)

Zelle Nr.	Relation $\frac{O}{V}$
39	10,5 (?)
40	14,7 (?)
41	14,2 (?)
42	15,4
43	15,6 (?)
44	25,0 (?)
45	20,2 (?)
46	14,9 (?)
47	15,3 (?)
48	11,9 (?)

Zelle Nr.	Relation $\frac{O}{V}$
49	20,2 (?)
50	15,9 (?)
51	14,1
52	20,6
53	10,4 (?)
54	19,4 (?)
55	14,6 (?)
56	23,1 (?)
57	14,7 (?)
58	14,1 (?)

Zelle Nr.	Relation $\frac{O}{V}$
59 a	15,1 (?)
59 b	17,8 (?)
60	14,1 (?)
61	18,9 (?)
62	19,4 (?)
63	20,5
64 a	23,4 (?)
64 b	17,1 (?)
65	15,3 (?)
66	17,4 (?)

Zelle Nr.	Relation $\frac{O}{V}$
67	15,7 (?)
68	15,0 (?)
69	12,2 (?)
70	12,8
71	13,9
72	17,2
73	13,8
74 u.75	12,6
76	14,1
77	15,9

Zelle Nr.	Relation $\frac{O}{V}$
78	13,8 (?)
79	17,9
80	14,6
81	15,5
82	14,9 (?)
83	18,9
84	19,0
85	13,2 (?)
86	16,8
87	19,5

Zelle Nr.	Relation $\frac{O}{V}$
88	16,0
89	16,6
90	20,0
91	15,1
92	11,8
93	21,4
94	12,0
95	15,5
96	16,5
97	11,6

Zelle Nr.	Relation $\frac{O}{V}$
98	15,0
99	14,9
100	13,9
101	12,5

Zelle Nr.	Relation $\frac{O}{V}$
102	15,3
103	13,4
104	20,2

Tabelle Nr. 3:
Verhältnis Oberfläche zu Volumen, errechnet nach der Formel von Sitte (1967). Die mit einem Fragezeichen versehenen Rechenergebnisse gelten für Zellen, die mit ihren Membranen danebenliegende berührten, so daß die Zellgrenzen nicht sicher auszumachen waren.

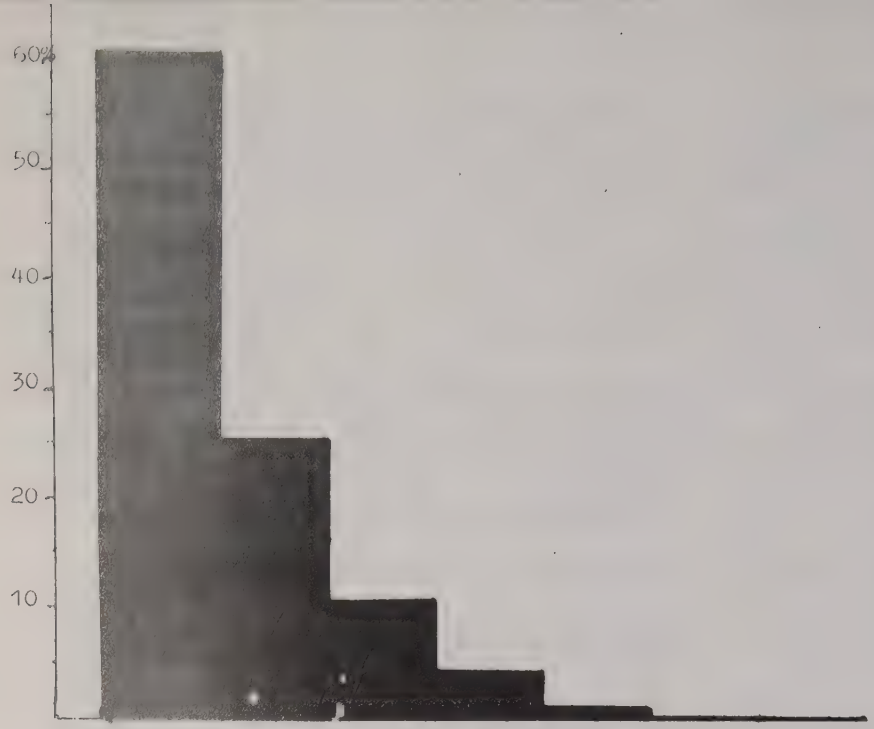

Diagramm 1:
Der prozentuale Anteil der einzelnen Zellkompartimente bei Einbettung 1 in der Reihenfolge: Plasma (55,6), Kern (25,0), Mitochondrien (7,7), endoplasmatisches Retikulum (4,2), Golgi-Körper (0,99), Tropfen (0,61) und Einschlüsse (0,25).

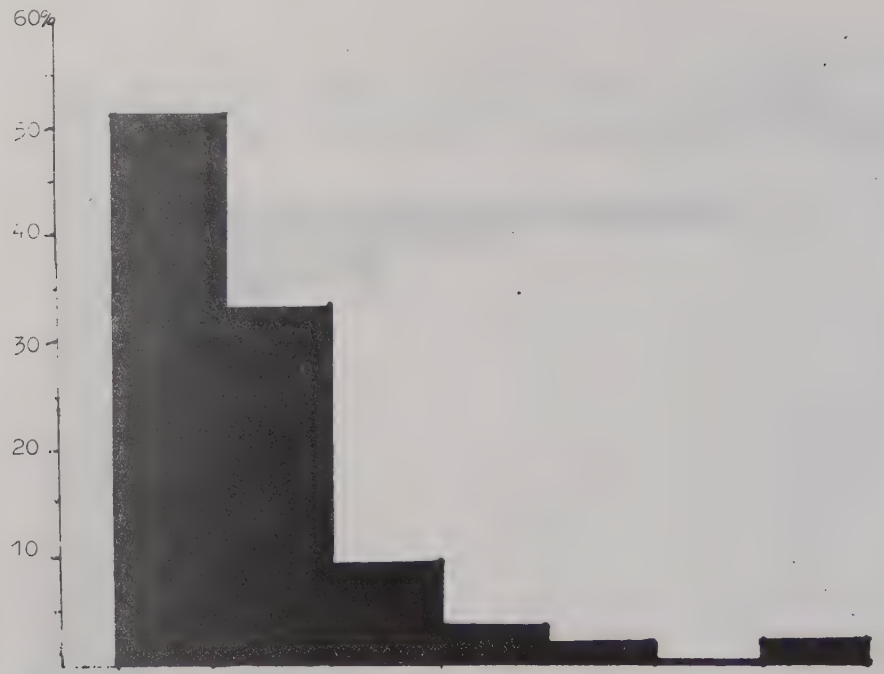

Diagramm 2:
Der prozentuale Anteil der einzelnen Zellkompartimente bei Einbettung in der Reihenfolge: Plasma (52,3), Kern (34,0), Mitochondrien (8,86), endoplasmatisches Retikulum (3,80), Golgi-Körper (1,59), Tropfen (1,72) und Einschlüsse (0,38).

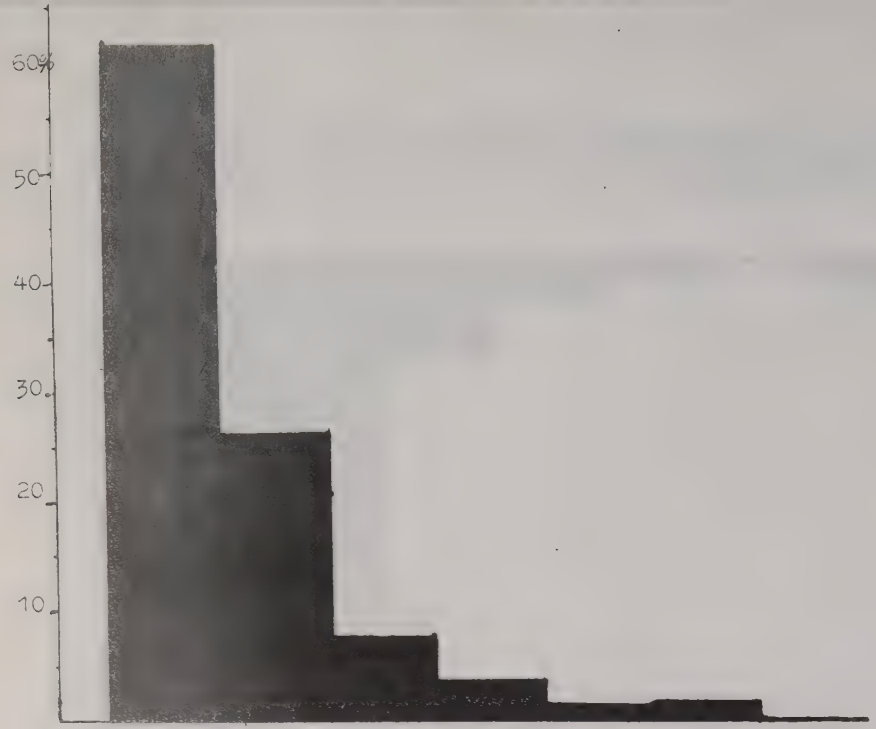

Diagramm 3:
Der prozentuale Anteil der einzelnen Zellkompartimente bei Einbettung 3 in der Reihenfolge: Plasma (61,9), Kern (26,5), Mitochondrien (8,0), endoplasmatisches Retikulum (3,6), Golgi-Körper (1,23), Tropfen (1,5) und Einschlüsse (0,085).

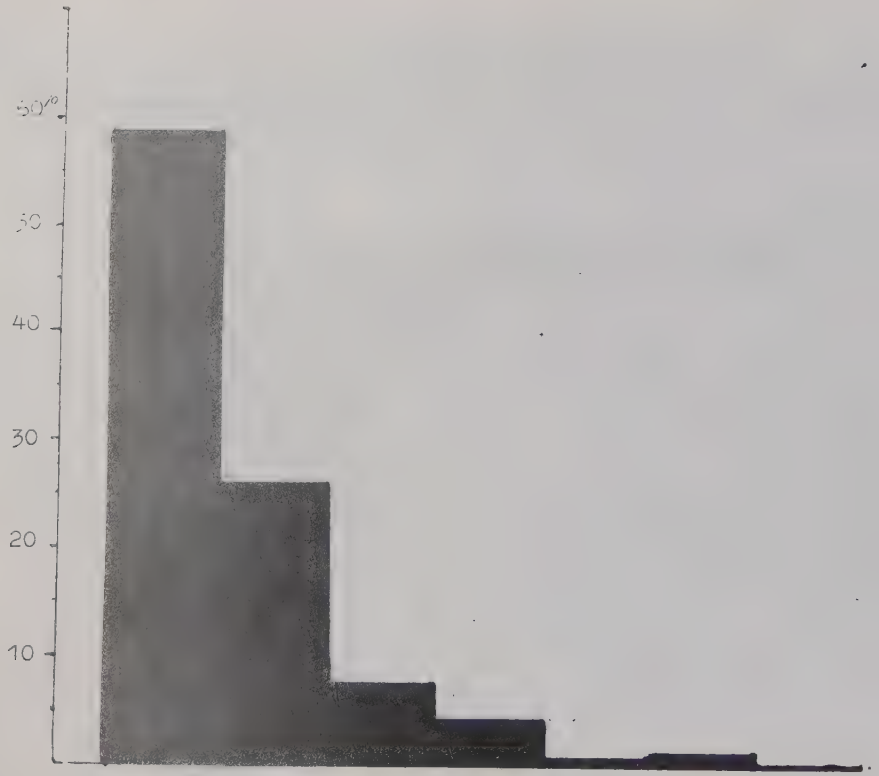

Diagramm 4:
Der prozentuale Anteil der einzelnen Zellkompartimente bei Einbettung 4 in der Reihenfolge: Plasma (59,3), Kern (24,9), Mitochondrien (8,0), endoplasmatisches Retikulum (4,16), Golgi-Körper (1,25), Tropfen (1,38) und Einschlüsse (0,18).

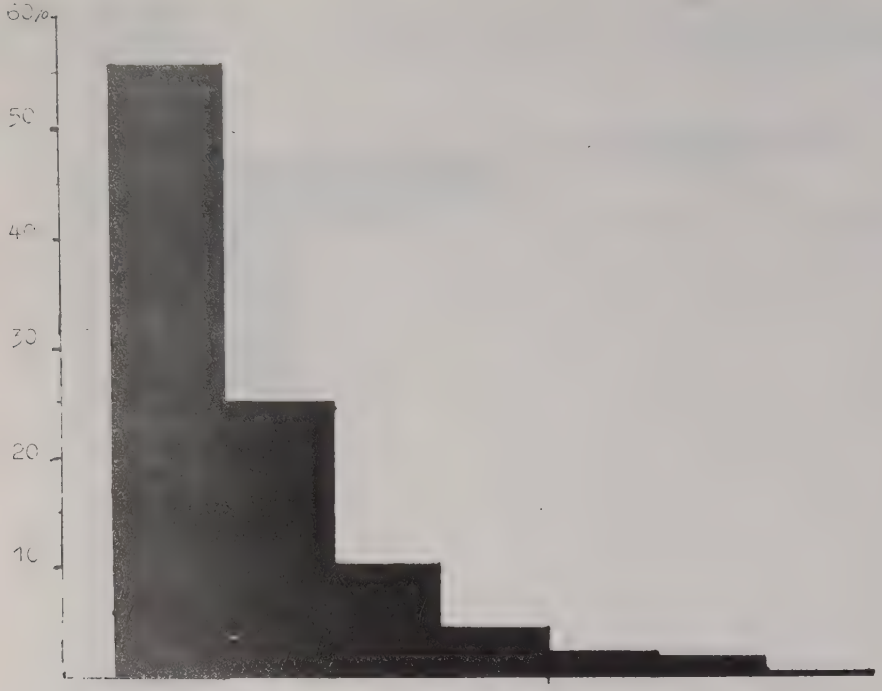

Diagramm 5:
Der prozentuale Anteil der einzelnen Zellkompartimente bei Einbettung 5 in der Reihenfolge: Plasma (56,3), Kern (24,7), Mitochondrien (9,5), endoplasmatisches Retikulum (4,56), Golgi-Körper (2,18), Tropfen (2,17) und Einschlüsse (0,46).

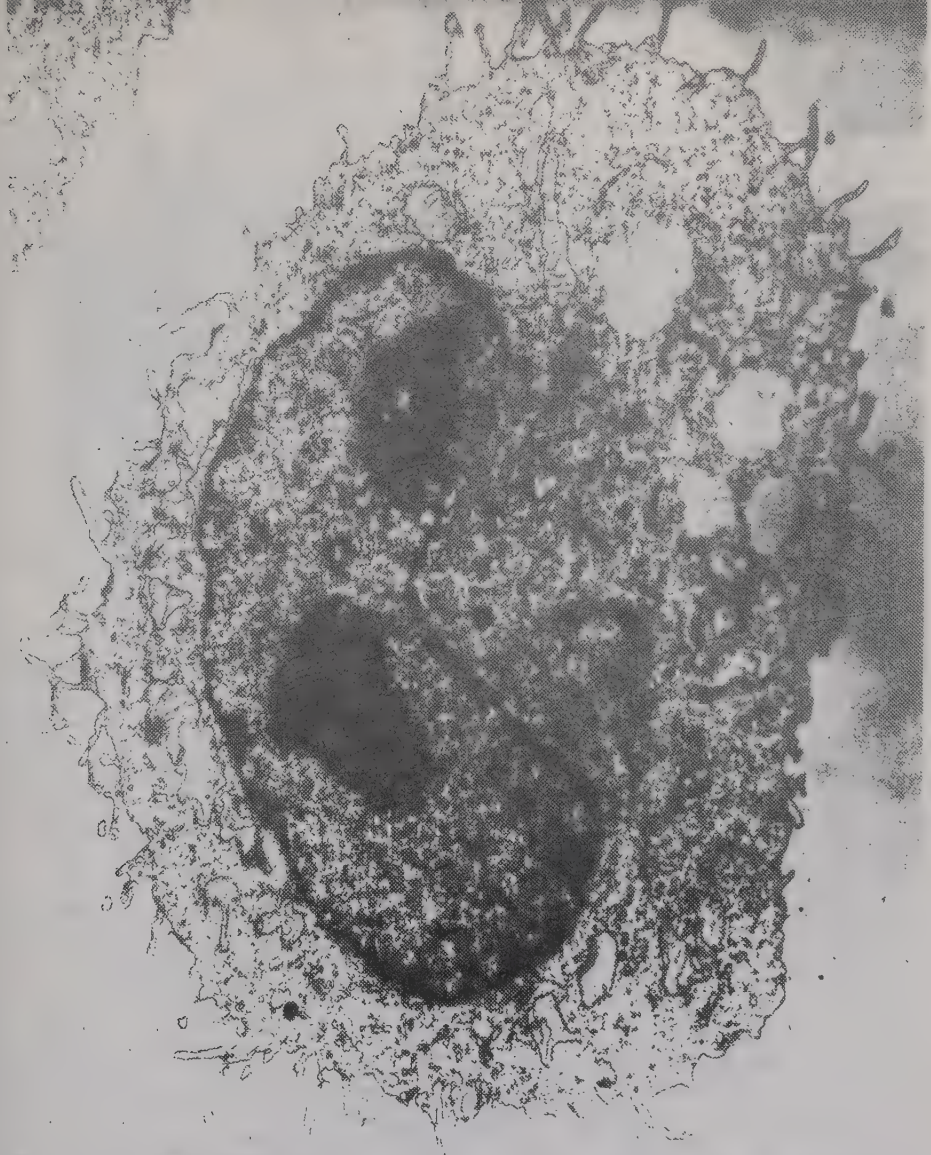

Bild Nr. 1:
Aszitestumorzelle einer Albino-Maus in 20.000-facher Vergrößerung. Der Kern enthält Chromatinklumpen, seine Membran ist als Doppellamelle zu erkennen. Die Mitochondrien sind von sehr verschiedener Form; die teils quer, teils längs getroffenen Christae bestehen aus deutlich sichtbaren Doppelmembranen. In der größten Breite des Plasmasaumes liegen vier Tropfen.

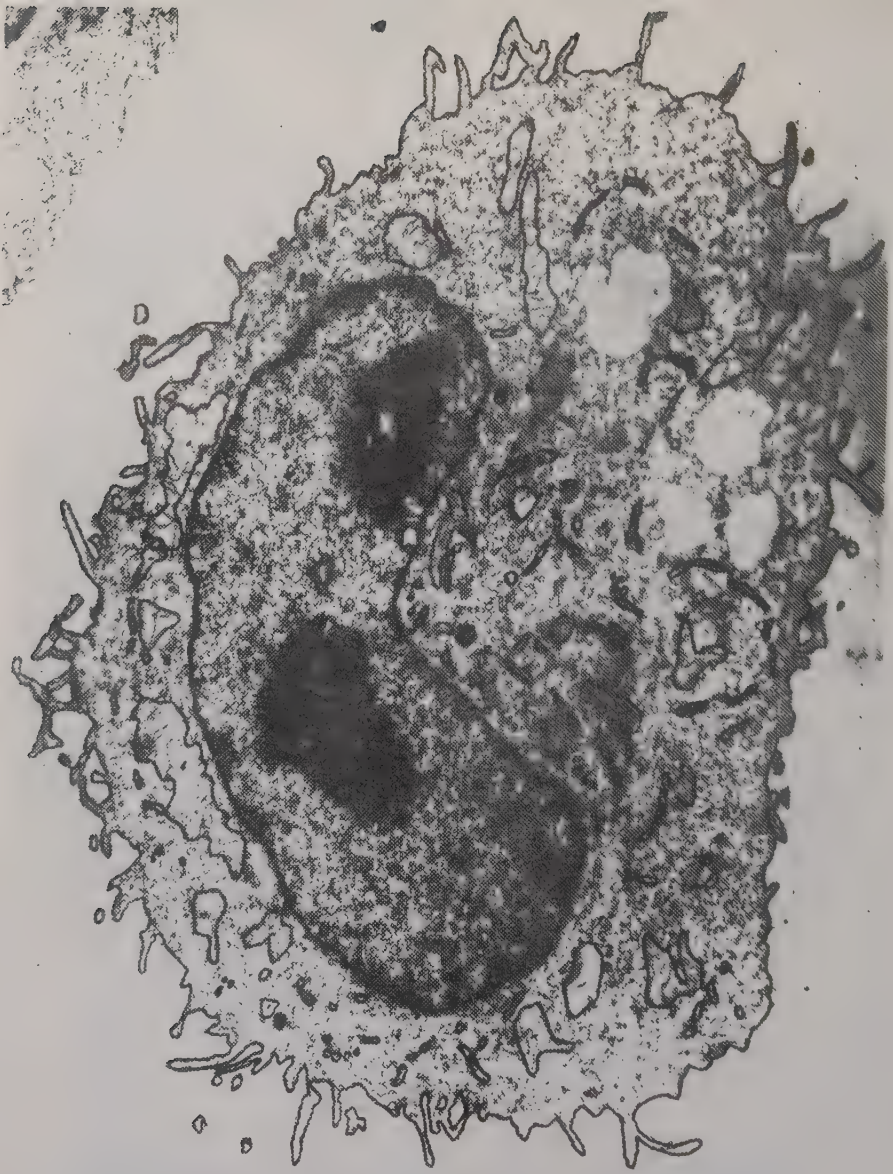

Bild Nr. 2:
Um beim Auszählen die einzelnen Strukturen leichter zu erkennen, wurden ihre Begrenzungen mit verschiedenfarbigen Stiften nachgezogen. Schwarz: Zellmembran, Kern, Mitochondrien (mit Punkt in der Mitte); rot: gröbste Strukturen des endoplasmatischen Retikulums; gelb:Tropf

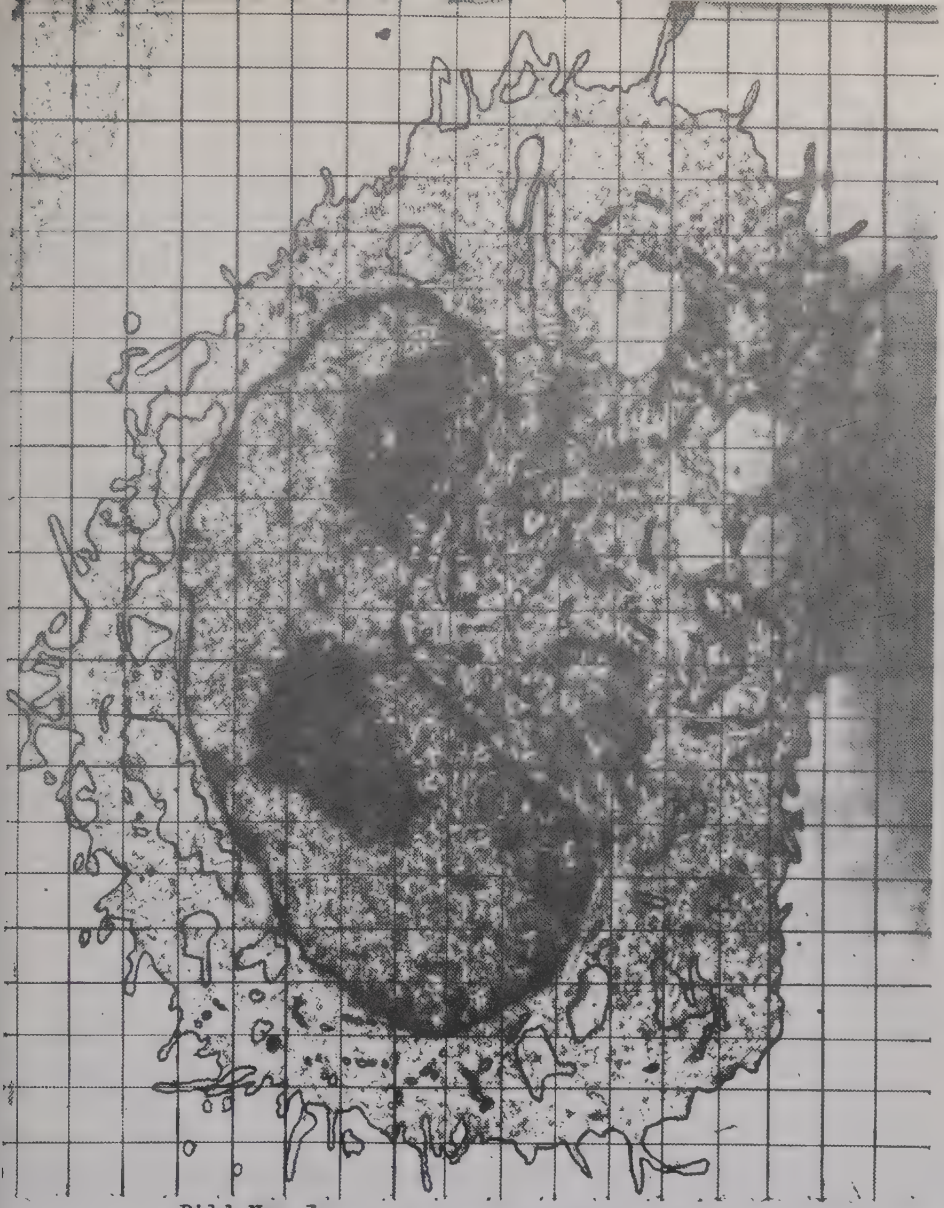

Bild Nr. 3:
Auf Bild 2 mit den nachgezogenen Strukturen wurde ein Raster mit 10 mm Seitenlänge gelegt. Die Kreuzpunkte, die auf die einzelnen Zellkompartimente fielen sowie die Schnittpunkte der waagerechten und senkrechten Linien mit der Zellmembran wurden gezählt. Kreuzpunkte, die von der Membran eines Zellkompartiments berührt wurden, waren als halber Treffer zu werten.

Literaturverzeichnis

HARRIS, J.W. Non-protein sulfhydryl content of Ehrlich ascites tumor cells exposed to hyperbaric or X-radiation. Exp. Cell Res. 50, (1968): 293-305

KLEIN, G. and FORSBERG, A.: Studies on the effect of X-rays on the biochemistry and cellular composition of ascites tumors. Exp. Cell Res. 6, (1954): 211-220

REYNOLDS, E.S.: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J.Cell Biol. 17, (1963): 208-212

SITTE, H.: Morphometrische Untersuchungen an Zellen. Aus "Quantitative Methoden in der Morphologie". Weibel, E.R., Elias, H., Springer Verlag, Berlin, Heidelber New York 1967

WESTPHAL, W.H.: Physikalisches Praktikum, 5. Auflage, Friedr. Viewe u. Sohn, Braunschweig 1948

YASUZUMI, G. and SUGIHARA, R.: The fine structure of nuclei as reveiled by electron microscopy. Exp.Cell Res. 37, (1965): 207-229

YASUZUMI, G. and SUGIHARA, R.: The fine structure of nuclei fixed by a double fixation procedure. Exp. Cell Res. 33, (1964): 578-580

ZBARSKY, I.B., DMITRIEVA, N.P. and YERMOLAYEVA, L.P.: On the structure of tumor cell nuclei. Exp. Cel Res. 27, (1962): 573-576

Lebenslauf

Am 18. August 1942 wurde ich, Paul Michael Schmidt, in Neunkirchen/Saar als Sohn von Eugen und Klara Schmidt geb. Boos, geboren. Am 1. September 1948 wurde ich in der Katholischen Volksschule in Spiesen/Saar eingeschult und wechselte am 1. Sept. 1953 zur Oberrealschule in Neunkirchen/Saar, wo ich am 29. März 1962 die Reifeprüfung ablegte.
Am 1. April 1962 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Würzburg. Am 20. Dezember 1967 bestand ich in Homburg/Saar die ärztliche Prüfung. Am 1. Februar 1968 wurde ich als Medizinalassistent am Institut für Biophysik, Homburg, angestellt und bin seit 15. September 1969 im Kreiskrankenhaus St.Ingbert beschäftigt.